cobas® TaqScreen West Nile Virus Test
for use on the cobas s 201 system

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC *IN VITRO*.

cobas® TaqScreen West Nile Virus Test	**WNV**	96 Tests	P/N: 04741722 190
cobas® TaqScreen West Nile Virus Control Kit	**WNV CTL**	6 Sets	P/N: 04741749 190
cobas® TaqScreen Wash Reagent	**TS WR**	5.1 L	P/N: 04404220 190

Pour appliquer à des échantillons de cadavres le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, l'utilisateur a besoin de la trousse suivante en plus des trousses citées ci-dessus :

cobas® TaqScreen Cadaveric Specimen Diluent Kit	**CADV SPEC DIL**	96 Tests	P/N: 05002125 190

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES 1
Liste des tableaux 2
UTILISATION 3
RÉSUMÉ ET DESCRIPTION DU TEST 3
PRINCIPES DU TEST 3
Pooling et pipetage automatisés des échantillons à l'aide du pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD 4
Préparation automatisée des échantillons à l'aide de l'appareil COBAS® AmpliPrep 4
Amplification automatisée de l'acide nucléique à l'aide de l'analyseur COBAS® TaqMan® 4
Transcription inverse et amplification par PCR 4
Amplification sélective 5
Détection automatisée en temps réel de produits de PCR à l'aide de l'analyseur COBAS® TaqMan® 5
Détection des produits de PCR 5
Gestion des données automatisée à l'aide du logiciel PDM 5
MATÉRIEL FOURNI PAR ROCHE 6
AUTRE MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS VENDU SÉPARÉMENT (ÉGALEMENT DISPONIBLE CHEZ ROCHE) 7
*Instruments et logiciel du système **cobas s** 201 – Configuration C ou Configuration C MR1 (Maintenance Release 1)* 7
Portoirs et produits jetables 7
RÉACTIFS 8
CONSERVATION ET MANIPULATION 10
PRÉCAUTIONS 11
PRÉPARATION DES RÉACTIFS 12
PRÉLÈVEMENT, CONSERVATION ET POOLING DES ÉCHANTILLONS 12
Échantillons de donneurs vivants 12
Échantillons de cadavres 14
POOLING ET PIPETAGE DES ÉCHANTILLONS 15
REMARQUES RELATIVES À LA PROCÉDURE 15
MODE D'EMPLOI 16
CONTRÔLE DE QUALITÉ 19

La section « Information sur les révisions apportées au document » est située à la fin de ce document.

RÉSULTATS 20
Repeat Needed 20
Test de pools - Resolution Needed 20
LIMITES DE LA PROCÉDURE 21
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE 21
ÉCHANTILLONS DE DONNEURS VIVANTS 21
Reproductibilité 21
Sensibilité analytique - étalon de Santé Canada - souche 1 23
Sensibilité analytique - étalon secondaire de VNO de Roche - souche 1 23
Sensibilité analytique - panel de virus du Nil occidental de CBER et de la FDA - souche 1 24
Sensibilité analytique - panel de qualification QWN701 d'ARN du virus du Nil occidental - souche 2 25
Spécificité analytique - réactions croisées potentielles et interférence de micro-organismes 26
Spécificité analytique - autres problèmes de santé 26
Substances potentiellement interférentes 27
Substances endogènes interférentes 27
Substances exogènes interférentes 27
ÉCHANTILLONS DE CADAVRES 28
Reproductibilité 28
Spécificité 29
Sensibilité analytique dans les échantillons de cadavres avec l'étalon secondaire de VNO de Roche 29
Sensibilité 31
PERFORMANCE CLINIQUE - ÉCHANTILLONS DE DONNEURS VIVANTS 32
Sensibilité clinique - Test d'échantillons positifs connus du virus du Nil occidental 32
Spécificité clinique 32
Résultats des tests de pools 33
Résultats des tests individuels 34
BIBLIOGRAPHIE 35

Liste des tableaux

Tableau 1 : Test de dépistage du virus du Nil occidental ***cobas***® *TaqScreen – résultats de reproductibilité* 22
Tableau 2 : Résumé de sensibilité analytique selon l'étalon de virus du Nil occidental de Santé Canada 23
Tableau 3 : Résumé de sensibilité analytique selon l'étalon secondaire de VNO de Roche 24
Tableau 4 : Résumé de sensibilité analytique selon le panel de virus du Nil occidental de CBER et de la FDA 24
Tableau 5 : Résumé de sensibilité analytique selon le panel de qualification QWN701 de l'ARN du virus du Nil occidental - souche 2 25
Tableau 6 : Micro-organismes testés 26
Tableau 7 : Résumé de reproductibilité des échantillons de cadavres et de donneurs vivants - Résultats par lot de trousse 28
Tableau 8 : Résumé de reproductibilité des échantillons de cadavres et de donneurs vivants - Résultats par paire opérateur-appareil 28
Tableau 9 : Résumé des tests de spécificité pour les échantillons de cadavres et de donneurs vivants avec le test de dépistage du VNO ***cobas***® *TaqScreen* 29
Tableau 10 : Résumé de sensibilité analytique selon l'étalon secondaire de VNO de Roche avec les échantillons de cadavres modérément hémolysés 30
Tableau 11 : Résumé de sensibilité analytique selon l'étalon secondaire de VNO de Roche avec une matrice d'échantillons hautement hémolysés 30

Tableau 12 : Résumé de sensibilité au VNO avec des échantillons de cadavre modérément hémolysés (MH) et hautement hémolysés (HH) *31*

Tableau 13 : Sensibilité clinique des échantillons positifs connus du virus du Nil occidental *32*

*Tableau 14 : Spécificité clinique du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen – tests de pools* *33*

*Tableau 15 : Spécificité clinique du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen – tests individuels* *34*

UTILISATION

Le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, utilisé avec le système **cobas s** 201, est un essai qualitatif *in vitro* destiné à la détection directe de l'ARN du virus du Nil occidental (VNO) dans le plasma humain.

Ce produit est destiné à être utilisé comme test de dépistage des donneurs afin de détecter l'ARN du VNO dans les échantillons de plasma de donneurs humains individuels, y compris les donneurs de sang total et de composants sanguins ainsi que d'autres donneurs vivants. Son usage est aussi prévu pour dépister des donneurs d'organe lorsque les échantillons de plasma sont prélevés pendant que le cœur du donneur bat encore ainsi que les échantillons de sang de donneurs décédés (cœur ayant arrêté de battre). Ce test n'est pas destiné à être utilisé sur des échantillons de sang de cordon ombilical.

Le plasma provenant de l'ensemble des donneurs peut être testé comme échantillons individuels. Pour les dons de sang total et de composants sanguins, les échantillons de plasma peuvent être testés en pools composés d'un maximum de six aliquotes égales provenant d'échantillons individuels. Pour les dons de tissus et d'organes provenant de donneurs décédés (cœur ayant arrêté de battre), les échantillons de plasma et de sérum peuvent uniquement être testés comme échantillons individuels.

Ce test n'est pas destiné à être utilisé comme aide au diagnostic.

RÉSUMÉ ET DESCRIPTION DU TEST

Le virus du Nil occidental appartient à la famille des Flaviviridae, au genre des Flavivirus et au complexe antigénique du virus de l'encéphalite japonaise. Les virus de ce complexe sont des arbovirus susceptibles de provoquer des méningites, des encéphalites et des méningo-encéphalites. Le groupe de l'encéphalite japonaise englobe le virus de l'encéphalite japonaise, le virus de l'encéphalite Murray Valley, le virus Kunjin (maintenant connu comme une variante du VNO) et le virus de l'encéphalite de Saint-Louis, ce dernier ayant entraîné une épidémie d'encéphalite aux États-Unis au milieu des années 70[1,2].

Le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen est un essai qualitatif qui permet le dépistage et la détection de l'ARN du VNO dans les dons d'échantillons individuels et de pools infectés. Le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen est un test qui utilise une technique générique de préparation des acides nucléiques sur l'appareil COBAS® AmpliPrep. L'ARN du VNO est alors détecté par une amplification par PCR automatisée et en temps réel effectuée sur l'analyseur COBAS® TaqMan®. Le test intègre un témoin interne, qui surveille la performance de chaque test effectué, ainsi que l'enzyme AmpErase pour réduire le risque de contamination provenant de matériel précédemment amplifié (amplicon).

PRINCIPES DU TEST

Le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen utilisé sur le système **cobas s** 201 comporte 4 opérations principales :

1. Pooling et pipetage automatisés des échantillons à l'aide du pipeteur Hamilton MICROLAB® STAR/STARlet IVD
2. Préparation automatisée des échantillons à l'aide de l'appareil COBAS® AmpliPrep
3. Amplification automatisée des acides nucléiques et détection en temps réel automatisée de produits de PCR à l'aide de l'analyseur COBAS® TaqMan®
4. Gestion des données automatisée à l'aide du logiciel Pooling and Data Management (PDM)

Pooling et pipetage automatisés des échantillons à l'aide du pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD

Le pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD automatise le pipetage des pools et des échantillons de donneur individuels, le transfert des aliquotes vers les plaques à puits profonds (optionnel) et le pipetage des témoins de tests. Le système **cobas s** 201 permet d'effectuer des tests de résolution de pools réactifs et d'identifier les échantillons réactifs individuels. Le système **cobas s** 201 est conçu pour traiter les échantillons en séries. Une série est un rassemblement d'échantillons et de témoins qui sont prélevés à la pipette, extraits, amplifiés et détectés ensemble. Lorsque le pipetage d'une série est terminé sur le pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD, tout le portoir des échantillons est transféré dans l'appareil COBAS® AmpliPrep afin de passer à la phase suivante du processus.

Remarque : Pour les tests d'échantillons de cadavres, l'échantillon doit être tout d'abord dilué manuellement dans un rapport de 1:5 dans le diluant d'échantillons de cadavres cobas® TaqScreen (CADV SPEC DIL) avant le pipetage au moyen du pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD.

Préparation automatisée des échantillons à l'aide de l'appareil COBAS® AmpliPrep

Les acides nucléiques des cibles et les molécules ajoutées du témoin interne (TI) Armored RNA (témoin du processus de préparation, d'amplification et de détection des échantillons) sont traités simultanément. Le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas®** TaqScreen contient des réactifs qui exécutent cinq étapes séquentielles sur l'appareil COBAS® AmpliPrep. La solution de protéase digère les protéines pour favoriser la lyse et l'inactivation des nucléases et pour faciliter la libération de l'ARN et de l'ADN des virions. L'ajout du réactif de lyse à un échantillon produit la lyse virale et l'inactivation des nucléases par la dénaturation des protéines. L'ARN et l'ADN sont libérés tout en étant protégés contre les nucléases. Les acides nucléiques libérés se lient à la surface de silice des particules magnétiques en verre ajoutées. Cela est dû essentiellement à la charge positive nette de la surface des particules en verre et à la charge négative nette des acides nucléiques sous la concentration de sel chaotropique et la force ionique de la réaction de lyse. Le réactif de lavage élimine les substances non liées et les impuretés telles que les protéines dénaturées, les débris cellulaires et les inhibiteurs de PCR (comme l'hémoglobine et autres), et réduit la concentration de sel. Les acides nucléiques purifiés sont libérés des particules magnétiques en verre à une température élevée à l'aide du tampon d'élution.

Amplification automatisée de l'acide nucléique à l'aide de l'analyseur COBAS® TaqMan®

Après l'isolation des acides nucléiques purifiés effectuée au cours de la préparation automatisée des échantillons, le mélange réactionnel **cobas®** TaqScreen WNV Master Mix (WNV MMX) permet l'amplification et la détection de l'ARN du VNO et de l'ARN du TI. Une fois activé par l'ajout d'acétate de manganèse, le mélange WNV MMX permet la transcription inverse, suivie de l'amplification par PCR d'un fragment d'ARN du VNO très bien conservé et de l'ARN du TI, à l'aide d'amorces spécifiques. La détection concomitante de l'ADN amplifié est réalisée par la génération de signaux de fluorescence à la suite de la dégradation nucléolytique en 5' des sondes spécifiques au VNO et au TI, également présentes dans le WNV MMX. Deux marqueurs fluorescents sont utilisés : un marque la sonde du TI et l'autre marque la sonde spécifique à la cible pour permettre l'identification distincte du VNO et du TI.

Transcription inverse et amplification par PCR

Les réactions de transcription inverse et d'amplification sont accomplies par une enzyme recombinante thermostable, l'ADN polymérase Z05. En présence de manganèse (Mn^{2+}), l'ADN polymérase Z05 a des activités de transcriptase inverse et d'ADN polymérase. Cela permet à la transcription inverse et à l'amplification par PCR de se produire dans le même mélange réactionnel.

L'amplification par PCR est réalisée à l'aide de l'ADN polymérase Z05 qui permet l'extension des amorces hybridées le long des matrices cibles pour produire une molécule d'ADN bicaténaire, appelée amplicon. Ce processus est répété au cours de multiples cycles, chaque cycle doublant la quantité d'ADN amplicon. L'amplification se produit uniquement dans la région des génomes cibles comprise entre les amorces; les génomes ne sont pas amplifiés en entier.

Amplification sélective

L'amplification sélective de l'acide nucléique cible de l'échantillon est réalisée lors du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen grâce à l'enzyme AmpErase (uracil-N-glycosylase) et à la désoxyuridine triphosphate (dUTP). L'enzyme AmpErase reconnaît et catalyse la destruction des brins d'ADN contenant de la désoxyuridine[3], mais pas l'ADN contenant de la désoxythymidine ou l'ARN contenant de la ribouridine[4,5]. L'ADN naturel ne contient pas de désoxyuridine, alors que l'amplicon en contient toujours à cause de l'utilisation de la désoxyuridine triphosphate avec la thymidine triphosphate comme un des dNTP du mélange réactionnel WNV MMX. Ainsi, seul l'amplicon contient de la désoxyuridine. La désoxyuridine rend les amplicons contaminants susceptibles d'être détruits par l'enzyme AmpErase avant l'amplification de l'ARN cible. L'enzyme AmpErase détruit également tout produit non spécifique formé après l'activation initiale du mélange réactionnel WNV MMX par le manganèse. L'enzyme AmpErase, contenue dans le mélange réactionnel WNV MMX, catalyse le clivage de l'ADN contenant de la désoxyuridine au niveau des résidus de désoxyuridine, en ouvrant la chaîne de désoxyribose en position C1. Lorsqu'elle est chauffée au cours de la première étape du cycle thermique, la chaîne d'ADN de l'amplicon se scinde à la position de la désoxyuridine, rendant ainsi l'ADN non amplifiable. L'enzyme AmpErase reste inactive durant une longue période si elle est exposée à une température supérieure à 55 °C et ne détruit donc pas l'amplicon cible formé après l'amplification par PCR.

Détection automatisée en temps réel de produits de PCR à l'aide de l'analyseur COBAS® TaqMan®

Pendant l'amplification par PCR, la température élevée intermittente au cours du cycle dénature l'amplicon cible et du TI pour former de l'ADN monocaténaire. Les sondes oligonucléotidiques de détection s'hybridentà la forme monocaténaire de l'ADN amplifié. L'amplification, l'hybridation et la détection se font simultanément.

Détection des produits de PCR

Le mélange réactionnel **cobas**® TaqScreen WNV MMX contient des sondes de détection spécifiques à l'acide nucléique du VNO et du TI. Chaque sonde de détection est marquée à l'aide de deux marqueurs fluorescents, un qui agit comme rapporteur et l'autre comme extincteur. Un type de rapporteur est associé à la sonde cible et est mesuré à une longueur d'onde déterminée. Un second type de rapporteur est associé à la sonde du TI et est mesuré à une longueur d'onde différente. Les deux sondes utilisent un seul type d'extincteur. Ce système permet la détection de la cible VNO amplifiée à une longueur d'onde et la détection simultanée de l'acide nucléique du TI amplifié à une longueur d'onde différente.

Avant le début de l'amplification par PCR, les sondes sont à l'état intact et le marqueur fluorescent rapporteur est supprimé par l'extincteur à cause du transfert d'énergie de type Förster. Au cours de l'amplification par PCR, les sondes s'hybridentaux séquences d'ADN monocaténaire et sont clivées par l'activité nucléasique 5' vers 3' de l'ADN polymérase Z05 au même moment où se produit l'amplification. Dès que ce clivage sépare les marqueurs rapporteur et extincteur, l'activité fluorescente du marqueur rapporteur se dévoile. Chaque cycle PCR génère un nombre croissant de sondes clivées et le signal cumulatif du marqueur rapporteur s'accroît en même temps.

La détection en temps réel des produits de PCR est effectuée par la mesure de la fluorescence des marqueurs rapporteurs libérés représentant de façon indépendante la cible de VNO et le TI[6,7].

Gestion des données automatisée à l'aide du logiciel PDM

Le logiciel PDM Data Manager de Roche permet à l'utilisateur d'examiner les résultats et de les rapporter. Le logiciel PDM Data Manager de Roche attribue un résultat non réactif, réactif ou non valide à tous les tests. En plus d'extraire et d'examiner les résultats de PCR, le logiciel PDM de Roche permet à l'opérateur d'imprimer des rapports, de rechercher des résultats, d'accepter les résultats de donneur et de transmettre, s'il le désire, les résultats à un SIL.

MATÉRIEL FOURNI PAR ROCHE

Trois trousses sont nécessaires et fournies pour permettre la détection de l'ARN du VNO dans les échantillons de plasma :

(1) le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, (2) la trousse de témoins de virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen et (3) le réactif de lavage **cobas**® TaqScreen. Le bureau local de Roche peut, sur demande, fournir les fiches de sécurité des produits (SDS).

cobas® TaqScreen West Nile Virus Test — **WNV** — **96 tests**
(P/N: 04741722 190)

WNV CS1
(cartouche de réactifs avec particules magnétiques en verre VNO)

WNV CS2
(cartouche de réactif de lyse VNO)

WNV CS2
(cartouche de réactifs multiples VNO)

WNV CS4
(cartouche de réactifs spécifiques au test VNO)

cobas® TaqScreen West Nile Virus Control Kit — **WNV CTL** — **6 ensembles**
Trousse de témoins du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen
(P/N: 04741749 190)

WNV (+) C
(témoin positif pour le VNO)

WNV (–) C
[témoin négatif pour le VNO (plasma humain)]

cobas® TaqScreen Wash Reagent — **TS WR** — **5,1 l**
Réactif de lavage **cobas**® TaqScreen
(P/N : 04404220 190)

TS WR
(Réactif de lavage **cobas**® TaqScreen)

Remarque : Pour la détection de l'ARN du VNO dans les échantillons de cadavres, la trousse suivante est nécessaire et fournie en plus des trousses citées ci-dessus : Trousse de diluant d'échantillons de cadavres cobas® TaqScreen.

cobas® TaqScreen Cadaveric Specimen Diluent Kit — **CADV SPEC DIL** — **96 tests**
Trousse de diluant d'échantillons de cadavres **cobas**® TaqScreen
(P/N : 05002125 190)

CADV SPEC DIL
(diluant d'échantillons de cadavres **cobas**® TaqScreen)

AUTRE MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS VENDU SÉPARÉMENT (ÉGALEMENT DISPONIBLE CHEZ ROCHE)

Ce test doit être réalisé sur le système **cobas s** 201. Le système **cobas s** 201 doit être installé par un représentant d'entretien de Roche Diagnostics, et utilisé en tant que configuration de système complet. Les composants individuels du système **cobas s** 201 ne peuvent pas être utilisés comme dispositifs autonomes, et ils ne peuvent pas être substitués. Le système **cobas s** 201 utilise les composants énumérés ci-après. Se reporter à la Fiche d'information du produit pour de l'information supplémentaire.

Instruments et logiciel du système cobas s 201 – Configuration C ou Configuration C MR1 (Maintenance Release 1)

- Pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD
- Appareil COBAS® AmpliPrep
- Analyseur COBAS® TaqMan® (avec mise à jour EX48)
- Station de données du logiciel AMPLILINK et logiciel v3.1.2 ou v3.2.1
- Serveur PDM Data Manager de Roche, station de travail Data Manager et logiciel v2.0.10 ou v2.0.14
- Manuel d'utilisation de la configuration C ou de la configuration C MR1 (Maintenance Release 1) du système **cobas s** 201
- Système **cobas s** 201 - Configuration C ou Mise à jour corrective 1 de la configuration C (MR1), liste des problèmes connus

Portoirs et produits jetables

- Portoirs des échantillons COBAS® AmpliPrep (SK24) (P/N: 28122172001)
- Portoirs des SPU COBAS® AmpliPrep (P/N: 05471664001)
- Portoirs de réactifs COBAS® AmpliPrep (P/N: 28122199001)
- Unités de traitement des échantillons (SPU) (P/N: 03755525001)
- Tubes d'entrée d'échantillon (tubes S) avec pinces à code-barres (P/N: 03137040001)
- Portoirs d'embouts K (P/N: 03287343001)
- Boîte de 12 x 96 tubes K (P/N: 03137082001)
- Portoir K COBAS® TaqMan® (P/N: 28150397001)
- Embouts CO-RE à grand débit (1000 µl), filtre (P/N: 04639642001)
- Plaques à puits profonds avec étiquettes à code-barres (P/N : 04639634001)
- Enduits protecteurs pour plaque à puits profonds (P/N : 04789288001)
- Portoir d'échantillons pour 24 tubes à essai (P/N: 04639502001)
- Portoir d'échantillons pour 32 tubes à essai (P/N: 04639529001)
- Portoir d'embouts (P/N: 04639545001)
- Portoir de plaque à puits profonds (P/N : 04639553001)
- Support de portoir SK24 (P/N: 04639600001)
- Désinfectant en vaporisateur Microcide SQ™ ou HAMILTON (P/N: 04592557001)
- Gants jetables, non poudrés

RÉACTIFS

cobas® TaqScreen West Nile Virus Test **WNV** **96 tests**
(P/N: 04741722 190)

WNV CS1 **2 x 48 tests**
MGP 2 x 7.0 ml
(Particules magnétiques en verre)
Particules magnétiques en verre
93 % d'isopropanol

Xi 93 % (p/p) d'isopropanol
Irritant

F 93 % (p/p) d'isopropanol
Hautement inflammable

WNV CS2 **2 x 48 tests**
LYS 2 x 78 ml
(Réactif de lyse)
Citrate de sodium dihydraté
42,5 % de thiocyanate de guanidine
< 14 % de polydocanol
0,9 % de dithiothréitol

Xn 42,5 % (p/p) de thiocyanate de guanidine
Nocif

WNV CS3 **2 x 48 tests**
Pase 2 x 3.8 ml
(Solution de protéinase)
Tampon TRIS
< 0,05 % d'EDTA
Chlorure de calcium
Acétate de calcium
≤ 7,8 % de protéinase
Glycérol

Xn ≤ 7,8 % (p/p) de protéinase
Nocif

WNV EB 2 x 7.0 ml
(tampon d'élution pour le VNO)
Tampon TRIS
≤ 0,002 % d'ARN poly rA (synthétique)
EDTA
0,09 % d'azoture de sodium

WNV CS4 **2 x 48 tests**

WNV MMX 2 x 2.5 ml

(mélange réactionnel WNV)

Tampon Tricine
Acétate de potassium
Glycérol
< 18 % de diméthylsulfoxyde
< 0,07 % de dATP, de dCTP, de dGTP, de dUTP
< 0,002 % d'amorces du VNO en amont et en aval
< 0,002 % de sonde VNO marquée par fluorescence
< 0,002 % de sonde de témoin interne marquée par fluorescence
< 0,002 % d'aptamère oligonucléotidique
< 0,05 % d'ADN polymérase Z05 (microbienne)
< 0,1 % d'enzyme AmpErase (uracile-N-glycosylase) (d'origine microbienne)
0,08 % d'azoture de sodium

WNV Mn^{2+} 2 x 19.8 ml

(solution de manganèse VNO)

< 0,6 % d'acétate de manganèse
Acide acétique glacial
0,09 % d'azoture de sodium

WNV IC 2 x 3.6 ml

(témoin interne pour le VNO)

Tampon TRIS
≤ 0,002 % d'ARN poly rA (synthétique)
EDTA
0,05 % d'azoture de sodium
< 0,001 % d'ARN de témoin interne, synthétique et non infectieux, encapsulé dans une protéine de coque du bactériophage MS2

cobas® TaqScreen West Nile Virus Control Kit **WNV CTL** **6 ensembles**

Trousse de témoins du virus du Nil occidental **cobas®** TaqScreen (P/N: 04741749 190)

WNV (+) C 6 x 1.1 ml

(témoin positif pour le VNO)

Tampon TRIS
≤ 0,002 % d'ARN poly rA (synthétique)
EDTA
0,05 % d'azoture de sodium
< 0,001 % d'ARN du VNO synthétique et non infectieux, encapsulé dans une protéine de coque du bactériophage MS2

WNV (–) C 12 x 1,6 ml

[témoin négatif pour le VNO (plasma humain)]

Plasma humain négatif, non réactif aux test agréés de détection des anticorps anti-VHC, des anticorps anti-VIH-1/2 et de l'antigène HBs ; ARN du VNO non détectable par les méthodes de PCR

0,1 % d'agent de conservation ProClin® 300

Xi

(3:1) mélange de 5-Chloro-2-méthyl-2H-isothiazol-3-one et de 2-Méthyl-2H-isothiazol-3-one

Irritant

R36/38 : Irritant pour les yeux et la peau.

R43 : Peut provoquer une sensibilisation par contact avec la peau.

cobas® TaqScreen Wash Reagent **TS WR** 5,1 L

Réactif de lavage **cobas®** TaqScreen

(P/N: 04404220 190)

TS WR

(réactif de lavage **cobas®** TaqScreen)

Citrate de sodium dihydraté

0,1 % de l'agent de conservation méthylparabène

cobas® TaqScreen Cadaveric Specimen Diluent Kit **CADV SPEC DIL** **96 tests**

Trousse de diluant d'échantillons de cadavres **cobas®** TaqScreen

(P/N: 05002125 190)

CADV SPEC DIL 4 x 100 ml

(Diluant d'échantillons de cadavres **cobas®** TaqScreen)

EDTA

CONSERVATION ET MANIPULATION

A. La température ambiante correspond à la plage comprise entre 15 et 30 °C.

B. Ne pas congeler les réactifs ou les témoins.

C. Conserver les réactifs **WNV CS1, WNV CS2, WNV CS3** et **WNV CS4** à une température de 2 à 8 °C. Ces réactifs, non ouverts, sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée.

D. Une fois un flacon ouvert, les réactifs sont stables pendant 30 jours à une température de 2 à 8 °C ou jusqu'à la date de péremption, le premier des deux prévalant.

E. Les réactifs peuvent être utilisés pendant 6 séries d'analyse, jusqu'à 40 heures cumulatives sur l'appareil COBAS® AmpliPrep. Les réactifs doivent être conservés à une température de 2 à 8 °C entre les cycles d'utilisation. Le logiciel AMPLILINK contrôle le nombre d'heures cumulatives d'utilisation des cassettes de réactif dans l'appareil COBAS® AmpliPrep et bloque l'utilisation des cassettes une fois atteintes les 40 heures cumulatives.

F. Les réactifs sont stables pendant 24 heures continues sur l'appareil COBAS® AmpliPrep. Le logiciel AMPLILINK ne contrôle pas le nombre d'heures continues d'utilisation des cassettes de réactif dans l'appareil ni le nombre de séries d'analyse pour lesquelles les cassettes ont été utilisées. C'est à l'utilisateur d'éliminer les cassettes de réactif une fois atteintes les 24 heures continues ou les 6 séries d'analyse.

G. Conserver les témoins **WNV (+) C** et **WNV (–) C** à une température de 2 à 8 °C. Les témoins sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée. Une fois un flacon ouvert, toute partie inutilisée doit être éliminée.

H. Conserver le réactif **TS WR** à une température de 15 à 30 °C. Le **TS WR** inutilisé est stable jusqu'à la date de péremption indiquée. Une fois un flacon ouvert, ce réactif est stable pendant 30 jours à une température de 15 à 30 °C ou jusqu'à la date de péremption en tenant compte du délai le plus court.

I. Conserver **CADV SPEC DIL** à une température de 15 à 30 °C. Le diluant est stable jusqu'à la date de péremption indiquée. Une fois un flacon ouvert, toute partie inutilisée dans le contenant doit être éliminée.

PRÉCAUTIONS

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC *IN VITRO*.

A. Les échantillons peuvent être infectieux. Prendre les précautions standard lors de la réalisation du test[8,9]. Cette procédure ne doit être effectuée que par des personnes habilitées à l'utilisation du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen et formées à la manipulation de matériel infectieux. Nettoyer et désinfecter soigneusement tous les plans de travail du laboratoire à l'aide d'une solution à 0,5 % d'hypochlorite de sodium préparée extemporanément avec de l'eau distillée ou déionisée. Nettoyer ensuite les plans de travail avec de l'éthanol à 70 %.

B. **AVERTISSEMENT : Le WNV (–) C contient du plasma humain dérivé de sang humain. Le produit source a été testé non réactif pour l'anticorps contre le HIV-1/2, l'anticorps contre le HCV et le HBsAg. Les tests par méthodes de PCR sur un plasma humain négatif indiquent un ARN du VNO non décelable. Cependant, aucune méthode de test connue ne peut garantir avec une certitude absolue que des produits dérivés du sang humain ne transmettront pas d'agents infectieux. Tous les produits à base de sang humain doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés en appliquant les précautions universelles.** En cas de déversement, désinfecter immédiatement à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (eau de Javel diluée) préparée extemporanément ou suivre les procédures appropriées du site.

C. Respecter les précautions habituelles du travail en laboratoire. Ne pas pipeter à la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail désignées. Porter des gants jetables, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et des réactifs de la trousse. Se laver soigneusement les mains après la manipulation des échantillons et des réactifs.

D. Les réactifs **WNV EB, WNV MMX, WNV Mn^{2+}, WNV IC** et **WNV (+) C** contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur. Ne pas utiliser des tubulures métalliques pour le transfert de réactifs. En cas d'élimination de solutions contenant de l'azoture dans les conduites d'évacuation, diluer ces solutions et rincer abondamment à l'eau courante. Ces précautions sont recommandées afin d'éviter l'accumulation de dépôts dans les conduites métalliques où des composés explosifs pourraient se former.

E. **L'héparine a un effet inhibiteur sur la réaction de PCR. Ne pas utiliser de plasma hépariné pour cette procédure de test.**

F. L'utilisation de pipettes jetables stériles et d'embouts de pipettes exempts de nucléase est recommandée. En cas de manquement lors de la manipulation et du traitement des échantillons, une contamination croisée des échantillons peut entraîner des résultats faussement positifs.

G. Utiliser uniquement les produits jetables fournis ou indiqués pour assurer une performance optimale du test.

H. Manipuler tout matériel contenant des échantillons ou des témoins conformément aux bonnes pratiques de laboratoire afin d'éviter la contamination croisée des échantillons ou des témoins.

I. Avant l'utilisation, examiner chaque cartouche de réactif, tube de témoins et réactif de lavage pour s'assurer de l'absence de fuites. En présence de fuite possible, ne pas utiliser ce matériel pour le test.

J. Éliminer tout matériel entrant en contact avec les échantillons et les réactifs conformément à la réglementation locale, nationale, fédérale ou gouvernementale applicable.

K. Ne pas utiliser un test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, la trousse de témoins du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, le réactif de lavage **cobas**® ni la trousse de diluant d'échantillons de cadavres **cobas**® TaqScreen après leur date d'expiration. Ne pas permuter, mélanger ou combiner des réactifs provenant de trousses ou de lots différents. Ne pas charger des lots de réactifs mélangés sur l'appareil COBAS® AmpliPrep.

L. Le bureau local de Roche peut, sur demande, fournir les fiches de sécurité des produits (SDS).

M. Éviter le contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. **En cas de contact, rincer immédiatement avec un grand volume d'eau afin d'éviter les brûlures.** En cas de déversement de ces réactifs, diluer avec de l'eau avant d'essuyer. **Éviter le contact du réactif de lyse (LYS), qui contient du thiocyanate de guanidine, avec une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel). Ce mélange peut générer un gaz hautement toxique.**

N. Se conformer aux procédures et aux directives fournies pour assurer l'exécution adéquate du test. Tout défaut de se conformer aux procédures et aux directives peut nuire à la performance optimale du test.

O. L'utilisation d'échantillons de donneurs vivants excessivement hémolysés doit être évitée.

P. La contamination en globules rouges des échantillons de plasma (> 5 %) peut inhiber le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

Q. N'utiliser dans aucune phase du test les composants dont les étiquettes à code-barres sont endommagées.

R. Lors des tests d'échantillons de cadavres, les échantillons qui sont de couleur paille à rose sont classés comme modérément hémolysés tandis que ceux qui sont de couleur rouge à rouge foncé ou brun sont classés comme des échantillons hautement hémolysés.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

A. Équilibrer les réactifs et les témoins WNV **cobas**® TaqScreen à température ambiante 30 minutes avant l'utilisation.

PRÉLÈVEMENT, CONSERVATION ET POOLING DES ÉCHANTILLONS

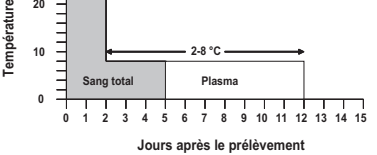
Remarque : Manipuler tous les échantillons comme s'ils étaient des agents infectieux.

Échantillons de donneurs vivants

A. Les échantillons de plasma prélevés à l'aide d'une solution d'EDTA, de CPD, de CPDA1, de CP2D, d'ACDA et de citrate de sodium à 4 % peuvent être utilisés avec le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Suivre les directives fournies par le fabricant des tubes de prélèvement. La stabilité de l'échantillon est affectée par des températures élevées.

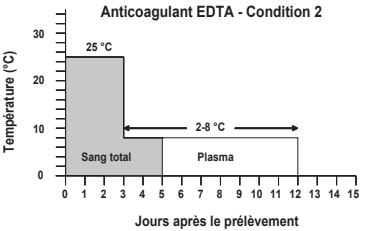
B. Le sang prélevé dans les anticoagulants EDTA K2 et EDTA K3 peut être conservé sous deux conditions.

Condition 1, le sang peut être conservé jusqu'à 24 heures à une température de 2 à 30 °C, suivi d'une période de 24 heures entre 2 et 25 °C, puis d'une période de 72 heures entre 2 et 8 °C, avant la séparation du plasma. Pour une conservation supérieure à cinq jours, séparer le plasma des globules rouges par centrifugation à 800-1600 x g pendant 20 minutes. Après séparation, le plasma peut être conservé à une température de 2 à 8 °C pendant sept jours, suivi d'une période maximale de 30 jours à une température de ≤ -20 °C.

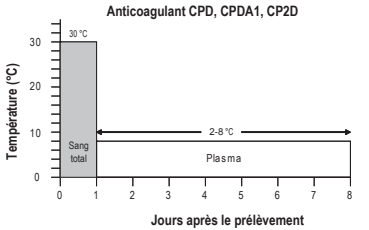


Condition 2, le sang peut être conservé jusqu'à 72 heures à une température de 2 à 25 °C, suivi d'une période de 48 heures entre 2 et 8 °C, avant la séparation du plasma. Pour une conservation supérieure à cinq jours, séparer le plasma des globules rouges par centrifugation à 800-1600 x g pendant 20 minutes. Après séparation, le plasma peut être conservé à une température de 2 à 8 °C pendant sept jours, suivi d'une période maximale de 30 jours à une température de ≤ -20 °C.

Le plasma EDTA K2 et EDTA K3 peut être congelé et décongelé à trois (3) reprises au maximum.



C. Le sang prélevé dans les anticoagulants CPD, CPDA1 et CP2D peut être conservé jusqu'à 24 heures à une température de 2 à 30 °C, avant la séparation du plasma. Pour une conservation supérieure à un jour, séparer le plasma des globules rouges par centrifugation à 800-1600 x g pendant 20 minutes. Après séparation, le plasma peut être conservé à une température de 2 à 8 °C pendant sept jours, suivi d'une période maximale de 30 jours à une température de ≤ -20 °C. Pour une conservation de longue durée, le plasma séparé des globules rouges peut être conservé à ≤ -70 °C pendant un maximum de 30 mois. Le plasma CPD, CPDA1 et CP2D peut être congelé et décongelé à trois (3) reprises au maximum.



D. Le plasma par aphérèse dans les anticoagulants ACDA ou citrate de sodium à 4 % peut être conservé jusqu'à 24 heures à une température de 2 à 30 °C, après le prélèvement. Le plasma par aphérèse peut être conservé jusqu'à 30 jours à ≤-20 °C. Le plasma par aphérèse dans l'ACDA ou une solution de citrate de sodium à 4 % peut être congelé et décongelé à trois (3) reprises au maximum.

E. Les lignes directrices suivantes en matière de volume plasmatique sont basées sur le pipetage à partir de tubes de 13 x 100 mm en plastique ou en verre effectué à l'aide du pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD. Les volumes indiqués correspondent au plasma en plus du concentré de globules rouges, et sont utilisés lors de l'exécution du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

Type de pool	Volume plasmatique minimal
Pool primaire de 6 *	3 ml
Pool primaire de 1 *	3 ml
Pool de répétition à partir du tube	1,5 ml
Pool de résolution à partir du tube	2 ml

*Comprend la création d'une plaque à puits profonds

F. **Ne pas congeler du sang complet.**

G. **L'héparine a un effet inhibiteur sur la réaction de PCR. L'utilisation d'échantillons héparinisés n'est pas recommandée**.

H. Les plaques à puits profonds couvertes peuvent être conservées à une température de 2 à 8 °C jusqu'à sept jours depuis la date de la séparation du plasma des globules rouges. Autrement, les plaques à puits profonds couvertes peuvent être conservées à ≤-18 °C pendant des périodes plus longues.

I. Aucun effet indésirable n'a été observé sur la performance du test lorsque les échantillons de plasma ont été soumis à trois (3) cycles de congélation et décongélation.

J. Équilibrer les échantillons individuels ou en pool à température ambiante avant utilisation.

K. Si les échantillons doivent être expédiés, ils doivent être emballés et étiquetés conformément aux réglementations fédérales et internationales applicables relatives au transport d'échantillons et d'agents étiologiques[10].

L. **En cas de contrôle inapproprié dans la manipulation et le traitement des échantillons, une contamination croisée des échantillons peut entraîner des résultats faussement positifs.**

Échantillons de cadavres

A. Les échantillons de sang de donneurs décédés recueillis dans des tubes d'anticoagulant EDTA ou des tubes de sérum peuvent être utilisés avec le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Suivre les directives fournies par le fabricant des tubes de prélèvement. La stabilité de l'échantillon est affectée par des températures élevées.

B. Le sang de cadavres recueilli dans un tube d'anticoagulant EDTA peuvent être conservés pendant jusqu'à 24 heures à une température de 2 à 25 °C avant la séparation du plasma. Pour une conservation supérieure à un jour, séparer le plasma des globules rouges par centrifugation à 800-1600 x g pendant 20 minutes. Après séparation, le plasma peut être conservé à une température de 2 à 8 °C pendant sept jours supplémentaires. On peut également conserver le plasma à une température ≤-18 °C pendant un maximum de 30 jours. Le plasma EDTA de cadavres peut être congelé et décongelé à trois (3) reprises au maximum.

C. Le sang de cadavres recueilli dans un tube de sérum peuvent être conservés jusqu'à 24 heures à une température de 2 à 8 °C avant la séparation. Pour une conservation supérieure à un jour, séparer le sérum du caillot par centrifugation à 800 - 1600 x g pendant 20 minutes. Après le retrait, les échantillons de sérum peut être conservés jusqu'à trois jours à une température de 2 à 8 °C. Dans le cas du sérum extrait du caillot, il est aussi possible de conserver les échantillons de sérum de cadavres modérément hémolysés à une température ≤ -18 °C pendant une durée maximale de 15 jours et les échantillons de sérum de cadavres hautement hémolysés à une température ≤ -18 °C pendant un maximum de 8 jours. Le plasma de sérum de cadavres peut être congelé et décongelé à trois (3) reprises au maximum.

D. Les échantillons de cadavres dilués dans un rapport de 1:5 dans le diluant d'échantillons de cadavres **cobas**® TaqScreen peuvent être conservés jusqu'à 7 jours à une température de 2 à 8 °C, et après un nouveau mélange (en pipetant chaque tube quatre (4) fois), ils peuvent subir le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

E. Si les échantillons doivent être expédiés, ils doivent être emballés et étiquetés conformément aux réglementations fédérales et internationales applicables relatives au transport d'échantillons et d'agents étiologiques.[10]

F. **En cas de manquement dans la manipulation et le traitement des échantillons, une contamination croisée des échantillons peut entraîner des résultats faussement positifs.**

POOLING ET PIPETAGE DES ÉCHANTILLONS

1. Le système **cobas s** 201 utilise le pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD pour l'ensemble du pipetage et du pooling. Le pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD effectue la lecture des code-barres et le pooling depuis des aliquotes égales d'échantillons pour former des pools.

2. Si des pools réactifs sont détectés par le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, le pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD effectue le pipetage d'échantillons individuels provenant soit des plaques à puits profonds soit des tubes d'échantillons initiaux pour réaliser un test de résolution.

REMARQUES RELATIVES À LA PROCÉDURE

A. Équipement

1. Préparer le système **cobas s** 201 conformément aux instructions du *Manuel d'utilisation du système **cobas s** 201*.

2. Effectuer la maintenance recommandée sur les appareils pour assurer un fonctionnement adéquat.

B. Réactifs

1. Le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, la trousse de témoins de virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen et le réactif de lavage **cobas**® TaqScreen doivent être équilibrés à température ambiante 30 minutes avant l'utilisation. Se reporter à la section *Conservation et manipulation* pour connaître les conditions de conservation des réactifs.

2. Chaque trousse du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen contient une quantité suffisante de matériel pour effectuer 96 tests réalisés en séries pouvant contenir jusqu'à 24 tests par portoir SK24. Un réplicat du témoin négatif [**WNV (–) C**] et un réplicat du témoin positif [**WNV (+) C**] doivent être traités avec chaque série ou portoir SK24.

3. Chaque trousse du test de diluant d'échantillons de cadavres **cobas**® TaqScreen contient une quantité suffisante de matériel pour effectuer 96 tests réalisés en séries pouvant contenir jusqu'à 24 tests par portoir SK24. Un réplicat du témoin négatif [**WNV (–) C**] et un réplicat du témoin positif [**WNV (+) C**] doivent être traités avec chaque série ou portoir SK24. Les témoins sont traités de la même manière pour les tests d'échantillons de cadavres et de donneurs vivants avec le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

4. Tous les témoins sont à usage unique.

5. Le système empêche l'utilisation des réactifs qui ont dépassé les heures autorisées sur l'appareil COBAS® AmpliPrep (plus de 40 heures cumulatives et 30 jours après la première utilisation), ainsi que des réactifs dont la date de péremption est expirée ou des cartouches mélangées provenant d'un ensemble de quatre cartouches précédemment utilisées sur le système.

C. Traitement des échantillons

1. Éviter de contaminer les gants lors de la manipulation des échantillons et des témoins.

2. Une attention particulière doit être portée afin d'éviter la contamination des échantillons et des témoins [**WNV (–) C**] par des témoins positifs.

MODE D'EMPLOI

Le système **cobas s** 201 comporte quatre opérations principales : le pipetage d'échantillons et de témoins à l'aide du pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD, la préparation des échantillons à l'aide de l'appareil COBAS® AmpliPrep et du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, l'amplification et la détection sur l'analyseur COBAS® TaqMan® et la gestion des données.

La configuration du système **cobas s** 201 permet la prise en charge d'un maximum de six pipeteurs Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD, cinq stations de travail Data Manager et dix stations de données AMPLILINK. Chaque station de données AMPLILINK peut prendre en charge jusqu'à trois appareils COBAS® AmpliPrep et deux analyseurs COBAS® TaqMan®. Se reporter au *Manuel d'utilisation du système* ***cobas s*** *201* pour obtenir des renseignements détaillés concernant la configuration du système **cobas s** 201.

Chaque trousse du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen contient huit cartouches : deux cartouches **WNV CS1** avec particules magnétiques en verre, deux cartouches **WNV CS2** avec réactif de lyse, deux cartouches **WNV CS3** avec protéase et tampon d'élution et deux cartouches **WNV CS4** avec TI, mélange réactionnel MMX et solution de manganèse. Cette trousse de test doit être utilisée avec la trousse de témoins du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen et le réactif de lavage **cobas**® TaqScreen ainsi que pour le traitement des échantillons de cadavres avec la trousse de diluant d'échantillons de cadavres **cobas**® TaqScreen.

Remarque : Ne pas ouvrir les cassettes.

Remarque : Ne pas mélanger des réactifs provenant de différents lots ou de flacons différents d'un même lot.

Remarque : Ne pas mélanger les réactifs (y compris les cassettes) provenant de trousses différentes. Ne pas charger des lots de réactifs mélangés sur l'appareil COBAS® AmpliPrep.

Remarque : Ne pas séparer les tubes de témoin des adaptateurs (le porte-tubes de témoin en plastique).

Remarque : Le logiciel PDM détecte et veille à ce qu'une série soit exécutée sur un seul appareil COBAS® AmpliPrep et analyseur COBAS® TaqMan® liés à la même station de données AMPLILINK.

Remarque : Ne pas répartir les séries sur plus d'un appareil COBAS® AmpliPrep ou un analyseur COBAS® TaqMan®.

Effectuer la maintenance requise, telle que le décrit le *Manuel d'utilisation du système* ***cobas s*** *201*.

Se reporter au *Manuel d'utilisation du système* ***cobas s*** *201* pour obtenir les directives d'utilisation détaillées. Il est important que l'utilisateur respecte les directives du *Manuel d'utilisation du système* ***cobas s*** *201* afin d'assurer une performance appropriée du test.

A. Pipetage des échantillons et des témoins à l'aide du pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD

Remarque : Éviter de contaminer les gants lors de la préparation des échantillons et des témoins.

Remarque : Mélanger au moins 3 fois les témoins en les retournant, en évitant la formation de bulles, tel que précisé ci-dessous.

- ***Chaque fois, le témoin est retourné vers le bas puis vers le haut.***
- ***Lors de chaque retournement, maintenir le témoin pendant 2 secondes au moins dans chaque direction (c.-à-d. tourner le témoin vers le bas et le maintenir dans cette position au moins 2 secondes. Puis le retourner vers le haut et le maintenir dans cette position pendant au moins 2 secondes.)***

Remarque : Pour le test d'échantillons de cadavres, l'utilisation de plaques à puits profonds est désactivée lors de l'installation du système cobas s 201.

A1. Effectuer les procédures de démarrage sur le pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD, puis démarrer le PDM Pooling Wizard de Roche en suivant les instructions à l'écran.

A2. Manipuler avec soin afin de ne pas endommager le code-barres d'identification sur les tubes d'échantillons et les adaptateurs de tubes de témoin. Si le code-barres est endommagé, le système ne pourra pas reconnaître les échantillons ou les témoins.

A3. Déboucher les tubes de témoin et charger les échantillons, les consommables et les témoins dans le pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD. Lorsque les échantillons, les consommables et les témoins sont chargés, l'appareil transfère les témoins et les échantillons dans des tubes S. Les échantillons et les témoins sont stables pendant un maximum de 5 heures dans les tubes ouverts et pendant 5 heures supplémentaires dans les tubes S.

A4. Pour les échantillons de cadavres individuels, pipeter 2000 µl de CADV SPEC DIL dans des tubes de 13 x 100 mm convenablement étiquetés, ajouter 500 µl d'échantillon de cadavre à chaque tube individuel et mélanger chaque échantillon en pipetant quatre (4) fois. Puis charger les échantillons, les consommables et les témoins dans le pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD. Lorsque les échantillons de cadavres dilués, les consommables et les témoins sont chargés, l'appareil transfère les témoins et les échantillons dans des tubes S. Les échantillons de cadavres dilués et les témoins sont stables jusqu'à 5 heures dans les tubes ouverts.

Remarque : Afin que l'appareil procède à une dilution 1:10 du témoin [WNV (+) C], deux tubes de témoin [WNV (–) C] doivent être chargés pour chaque tube de témoin [WNV (+) C] utilisé.

A5. Lorsque le cycle de pipetage est terminé, examiner les alarmes et imprimer les rapports de pooling. Procéder à l'inspection des pools et des puits des plaques à puits profonds. Invalider les pools et/ou les puits si une contamination en globules rouges est observée ou si les volumes sont incohérents.

A6. Refermer les tubes S et transférer le ou les portoirs SK24 sur l'appareil COBAS® AmpliPrep pour procéder à l'extraction de l'acide nucléique. Une fois transférés dans l'appareil COBAS® AmpliPrep, toutes les cibles virales et tous les témoins sont stables pendant 5 heures dans les tubes S.

A7. Refermer et entreposer les plaques à puits profonds (si des plaques ont été créées au cours du cycle de pipetage). Les plaques à puits profonds peuvent être conservées jusqu'à 7 jours à une température de 2 à 8 °C pour des périodes prolongées ou à ≤ -18 °C pour des périodes prolongées.

A8. Retirer et entreposer les tubes de donneur. Se reporter à la section *Prélèvement, conservation et pooling des échantillons* pour connaître les conditions de conservation.

A9. Retirer et éliminer les tubes de témoin. (Les tubes de témoin sont à usage unique.)

B. Préparation et chargement des réactifs du test de dépistage du virus du Nil occidental cobas® TaqScreen

Remarque : Manipuler avec précaution afin de ne pas endommager les étiquettes de cartouche. Le lecteur de code-barres de l'appareil COBAS® AmpliPrep lit automatiquement l'étiquette à code-barres de chaque cartouche lorsque les portoirs de réactifs sont chargés sur l'appareil.

B1. Équilibrer les réactifs à température ambiante au moins 30 minutes avant le traitement du premier échantillon. Aucune autre préparation de réactif n'est nécessaire.

B2. Avant de commencer, une quantité suffisante de cartouches doit être chargée afin de tenir compte du nombre total d'échantillons qui seront traités au cours du fonctionnement en continu de l'appareil COBAS® AmpliPrep. Chaque cartouche contient une quantité suffisante de réactifs pour effectuer 48 tests. Se reporter au *Manuel d'utilisation du système **cobas s** 201* pour obtenir des renseignements concernant le chargement des réactifs pour un fonctionnement en continu.

B3. Installer la cartouche **WNV CS1** dans le portoir de réactif; s'assurer que le code- barres de la cartouche est bien aligné avec le code-barres du portoir situé sur le côté droit du portoir. Les cartouches **WNV CS1** doivent être chargées ensemble sur un portoir de réactifs distinct des autres cartouches.

B4. Installer le portoir de réactifs contenant le **WNV CS1** à la position de portoir A, en glissant vers le haut jusqu'au butoir de l'appareil COBAS® AmpliPrep, puis attendre que la DEL du portoir de réactifs tourne au vert avant de glisser le portoir au fond de l'appareil à sa position finale. Ne pas charger des lots de réactifs mélangés dans l'appareil.

B5. Installer un ensemble de cartouches **WNV CS2, WNV CS3** et **WNV CS4** pour chaque cartouche **WNV CS1** dans un portoir de réactifs et s'assurer que les codes-barres de la cartouche sont alignés avec le code-barres du portoir situé sur le côté droit du portoir.

B6. Installer les portoirs de réactifs à la position de portoir B, C, D ou E, en glissant vers le haut jusqu'au butoir de l'appareil COBAS® AmpliPrep, puis attendre que la DEL du portoir de réactifs passe au vert avant de glisser le portoir au fond de l'appareil à sa position finale.

B7. Les voyants DEL sur la barre d'état de l'appareil COBAS® AmpliPrep passent au vert lorsque tous les composants requis de la trousse sont chargés et reconnus par le système.

C. Extraction des acides nucléiques des échantillons et des témoins pipetés

Remarque : Exécuter les étapes suivantes sur une table de travail stérile.

C1. Retirer l'enveloppe de l'unité de traitement des échantillons (SPU), et garder intacts le ruban et le revêtement en plastique.

C2. La grande languette du portoir SPU orientée vers l'opérateur, insérer le lot SPU au même niveau que le côté droit du portoir SPU.

C3. Enlever le ruban et le revêtement en plastique des SPU logées dans le portoir. S'assurer que toutes les SPU sont enfoncées, à niveau et bien logées dans le portoir. Des SPU surélevées peuvent entraîner une défaillance de l'appareil. Ne pas mettre de pression sur l'embout S de la SPU.

C4. Glisser les portoirs SPU chargés dans l'appareil COBAS® AmpliPrep aux positions de SPU I, J ou K jusqu'à ce que le portoir soit entièrement inséré et reconnu. L'appareil peut accueillir jusqu'à 72 SPU à la fois. Installer le nombre minimal de SPU requis pour le cycle, ou en ajouter au besoin.

C5. Retirer l'enveloppe de cellophane des portoirs de tubes K et d'embouts K chargés par le fabricant en prenant soin de ne pas faire basculer les portoirs. S'assurer qu'ils sont tous logés convenablement.

C6. Glisser aux positions M, N, O ou P le nombre minimal requis de portoirs de tubes K et d'embouts K dans l'appareil COBAS® AmpliPrep.

C7. Créer des ordres au poste de travail à l'aide du logiciel AMPLILINK.

C8. Charger aux positions F, G ou H de l'appareil COBAS® AmpliPrep, les portoirs SK24 contenant les échantillons et les témoins pipetés à l'aide du pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD. Glisser jusqu'au verrouillage du portoir. Vérifier la fenêtre Sample d'état du système pour s'assurer que tous les échantillons de chaque portoir ont été reconnus.

C9. Vérifier le logiciel AMPLILINK pour s'assurer que la quantité de matériel et de consommables chargée corresponde à la préparation d'échantillon voulue.

C10. Appuyer sur le bouton Start de la station de travail du logiciel AMPLILINK pour commencer la préparation des échantillons de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

C11. Les embouts K et les tubes K non utilisés restent verrouillés dans l'appareil COBAS® AmpliPrep jusqu'au prochain cycle.

D. Amplification et détection

Remarque : La stabilité du mélange réactionnel Working Master Mix avec les échantillons traités contenus dans le portoir SK24 est limitée. L'appareil COBAS® TaqMan® doit être prêt à recevoir les échantillons dès que l'appareil COBAS® AmpliPrep a terminé la procédure de préparation des échantillons.

D1. Transférer le portoir SK24 contenant les échantillons traités vers l'analyseur COBAS® TaqMan®. L'analyseur COBAS® TaqMan® commence automatiquement l'amplification et la détection. Le cycle de l'analyseur COBAS® TaqMan® doit débuter moins de 1 heure après la fin de la préparation des échantillons pour ce portoir SK24. Les résultats des portoirs SK24 qui ne sont pas transférés dans un délai d'une heure ne seront pas valides, exception faite des résultats réactifs dans un lot valide qui sont signalés comme réactifs.

D2. Lorsque l'analyseur COBAS® TaqMan® a terminé l'amplification et la détection, les échantillons analysés sont automatiquement éliminés et jetés dans la poubelle.

D3. Accepter les résultats sur la station de travail du logiciel AMPLILINK.

D4. Les résultats sont automatiquement transférés vers le logiciel PDM.

E. Révision et divulgation des résultats

E1. Démarrer la station de travail PDM de Roche.

E2. Extraire les séries non évaluées dans l'onglet « Review Batches » de la station de travail Data Manager.

E3. Examiner les alarmes en mettant en évidence une série, puis cliquer sur « Next ».

E4. Examiner les résultats des témoins dans l'onglet « Controls Review ». Pour connaître les critères de validité des témoins se reporter à la section *Contrôle de qualité*.

E5. Examiner le résultat du pool dans l'onglet « Alarms Review » de la série sélectionnée. Les pools non réactifs peuvent être invalidés manuellement par l'utilisateur, au besoin. Les échantillons de donneur dans un pool non valide doivent être testés de nouveau.

E6. Examiner et libérer les donneurs dans l'onglet « Donor Review » de la série sélectionnée.

E7. Imprimer les rapports et envoyer au système d'information de laboratoire (SIL), le cas échéant.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

1. Un réplicat du témoin négatif [**WNV (–) C**] et un réplicat du témoin positif [**WNV (+) C**] doivent être traités avec chaque série.

2. État de la série : Un état de série « Complete, Valid » est attribué lorsque les témoins de la série sont valides. Si un témoin d'une série est non valide, toute la série est non valide. Le logiciel PDM rend automatiquement les résultats non valides selon les défaillances de témoin.

    a. Témoin négatif

    Pour que le témoin négatif [**WNV (–) C**] soit valide, le résultat interprété doit être non réactif et le témoin interne correspondant doit être valide. Si le témoin interne est non valide, le résultat interprété du témoin négatif est non valide. Si le résultat interprété du témoin négatif est non valide, la totalité de la série est non valide et doit être répétée.

    b. Témoin positif

    Pour que le témoin positif [**WNV (+) C**] soit valide, le résultat interprété doit être réactif et le témoin interne correspondant doit être valide. Si le témoin interne est non valide, le résultat interprété du témoin positif est non valide. Si le résultat interprété du témoin positif est non valide, la totalité de la série est non valide et doit être répétée.

3. Témoin interne des échantillons de donneur

    a. Pour qu'un échantillon de donneur ait un résultat de test non réactif (-) valide, le témoin interne correspondant doit être valide; autrement, le résultat non réactif est non valide et l'échantillon de donneur doit être testé de nouveau.

    b. Pour qu'un échantillon de donneur ait un résultat de test réactif valide, le témoin interne correspondant doit être valide ou non valide.

RÉSULTATS

1. Les résultats des échantillons sont valides uniquement si la série qui les contient est valide. Se reporter à la section *Contrôle de qualité* pour connaître les critères d'acceptation. Deux paramètres sont mesurés pour chaque échantillon, un pour la cible VNO et l'autre pour le témoin interne.

2. Les résultats de donneur finaux du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen sont présentés par le logiciel PDM comme suit :

État	Signification
Complete Non-Reactive	Le donneur est non réactif au VNO.
Complete Reactive	Le donneur est réactif au VNO.
Complete Unresolved	Le délai de viabilité s'est terminé avant qu'un état réactif ou non réactif soit attribué au donneur. Aucun autre test ne peut être effectué sur le système pour ce donneur. (Se reporter au *Manuel d'utilisation du système* ***cobas s*** *201* pour obtenir une description du délai de viabilité.)

3. Donneurs qui requièrent un test supplémentaire : les tubes de donneur dont l'état du pool ou l'état du don individuel est non valide et qui reçoivent l'état « Repeat Needed » et les tubes de donneur contenus dans un pool réactif qui reçoivent l'état « Resolution Needed ».

Repeat Needed

Les tubes de donneur dont l'état du pool ou l'état du don individuel est « invalid » requièrent un nouveau test faisant partie d'une analyse répétée individuelle ou en pool.

Test de pools – Resolution Needed

Lorsqu'un pool, faisant partie d'un test de pool, est déclaré réactif par le système **cobas s** 201, l'état « Resolution needed » est attribué aux donneurs associés à ce pool et le pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD effectue le pipetage des échantillons individuels depuis les plaques à puits profonds ou les tubes d'échantillon initiaux pour réaliser le test de résolution. Le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen permet d'identifier l'échantillon réactif individuel à l'aide des mêmes méthodes (testées en simple) qu'avec les échantillons en pool.

Si au moins un échantillon individuel d'un pool est réactif, le ou les échantillons réactifs sont déclarés « Complete Reactive » et le reste des échantillons négatifs associés au pool positif est déclaré « Complete, Non-reactive ». Si tous les échantillons de donneur individuels de ce pool sont négatifs, les échantillons de ce pool sont tous déclarés « Complete, Non-reactive ».

LIMITES DE LA PROCÉDURE

1. Le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen doit être utilisé uniquement avec la trousse de témoins de virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, le réactif de lavage **cobas**® TaqScreen et le système **cobas s** 201.
2. Pour le test d'échantillons de cadavres, le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a uniquement été évalué pour une utilisation avec la trousse de diluant d'échantillons de cadavres **cobas**® TaqScreen, la trousse de témoins du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, le réactif de lavage **cobas**® TaqScreen et le système **cobas s** 201.
3. L'héparine a un effet inhibiteur sur la réaction de PCR. Ne pas utiliser de plasma héparinisé lors de cette procédure.
4. La fiabilité des résultats dépend du prélèvement et du transport appropriés des échantillons.
5. La détection d'ARN du VNO dépend de la quantité de virions présents dans l'échantillon et peut être influencée par les méthodes de prélèvement d'échantillon, les facteurs du patient (c.-à-d. l'âge et la présence de symptômes), le stade de l'infection et la taille du groupe.
6. Le pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD a été validé uniquement pour une utilisation avec le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, pour la préparation automatisée de pools de plasma. Respecter les instructions relatives au matériel et les mesures de sécurité mentionnées dans le *Manuel d'utilisation du système **cobas s** 201* et dans le Manuel de l'utilisateur du pipeteur Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD.
7. Les membres du complexe antigénique de l'encéphalite japonaise (encéphalite japonaise, encéphalite Murray Valley, encéphalite de Saint-Louis et virus Kunjin) peuvent également être réactifs au test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.
8. Les mutations, très rares, dans un fragment très bien conservé du génome viral compris par les amorces et/ou les sondes du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen peuvent provoquer l'échec de la détection du virus.
9. Étant donné les différences inhérentes entre les technologies, il est recommandé aux utilisateurs de réaliser des études de corrélation entre les méthodes dans leur laboratoire avant de passer d'une technologie à une autre afin de caractériser les différences de technologie. Les utilisateurs doivent appliquer leurs propres politiques/procédures.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

ÉCHANTILLONS DE DONNEURS VIVANTS

Reproductibilité

La reproductibilité du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen à l'aide du système **cobas s** 201 a été évaluée par un essai à répartition aléatoire et à l'insu sur un panel de 21 membres composé de six échantillons de plasma négatifs, de six échantillons de plasma positifs à une concentration de 0,49 fois la limite de détection (LDD) du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, et de groupes de trois échantillons de plasma positifs à des concentrations respectives de 2,5, 5 et 10 fois la LDD. La vérification a été effectuée à 3 sites avec 1 opérateur à chaque site utilisant 3 lots du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen et 1 système **cobas s** 201. À chaque site, 4 panels, avec les témoins positifs et négatifs correspondants, ont été testés chaque jour pendant 5 jours, pour un total de 180 tests pour chaque membre du panel. Les données de reproductibilité valides ont été évaluées en calculant le pourcentage de résultats de test réactifs pour chaque niveau de panel. Les données ont été analysées par lot de trousse, site/opérateur, jour/cycle et intégral (Tableau 1). L'étude montre une performance stable du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen dans l'ensemble des lots de la trousse, de la vérification du site/opérateur et du jour/cycle.

Tableau 1
Test de dépistage du virus du Nil occidental cobas® TaqScreen – résultats de reproductibilité

Concentration	Lot de trousse	Pourcentage de résultats négatifs par lot de trousse	Site/opérateur du test	Pourcentage de résultats négatifs par site/ opérateur du test	Jour/cycle *	Pourcentage de résultats négatifs par jour/cycle	Pourcentage global (IC à 95)**
	Lot à lot		Site à site			Essai à essai	Total
Négatifs	A	100,0 (359/359)	1	100,0 (360/360)	1	100,0 (209/209)	100,0 (1077/1077) (99,7, 100,0)
	B	100,0 (359/359)	2	100,0 (359/359)	2	100,0 (198/198)	
	C	100,0 (359/359)	3	100,0 (358/358)	3	100,0 (209/209)	
					4	100,0 (192/192)	
					5	100,0 (203/203)	
					6	100,0 (66/66)	
Concentration	**Lot de trousse**	**Pourcentage de résultats réactifs par lot de trousse**	**Site/opérateur du test**	**Pourcentage de résultats réactifs par site/ opérateur du test**	**Jour/cycle ***	**Pourcentage de résultats réactifs par jour/cycle**	**Pourcentage global (IC à 95)****
	Lot à lot		**Site à site**			**Essai à essai**	**Total**
0,49x LDD	A	73,9 (264/357)	1	75,5 (271/359)	1	71,5 (148/207)	73,4 (791/1077) (70,7, 76,1)
	B	72,2 (260/360)	2	74,7 (269/360)	2	68,2 (135/198)	
	C	74,2 (267/360)	3	70,1 (251/358)	3	74,6 (156/209)	
					4	78,1 (150/192)	
					5	74,6 (153/205)	
					6	74,2 (49/66)	
2,5x LDD	A	99,4 (179/180)	1	100,0 (180/180)	1	100,0 (105/105)	99,8 (538/539) (99,0, 100,0)
	B	100,0 (179/179)	2	100,0 (179/179)	2	100,0 (98/98)	
	C	100,0 (180/180)	3	99,4 (179/180)	3	100,0 (105/105)	
					4	100,0 (96/96)	
					5	99,0 (101/102)	
					6	100,0 (33/33)	
5,0x LDD	A	99,4 (178/179)	1	100,0 (180/180)	1	99,0 (103/104)	99,8 (537/538) (99,0, 100,0)
	B	100,0 (179/179)	2	100,0 (179/179)	2	100,0 (99/99)	
	C	100,0 (180/180)	3	99,4 (178/179)	3	100,0 (104/104)	
					4	100,0 (96/96)	
					5	100,0 (102/102)	
					6	100,0 (33/33)	
10,0x LDD	A	100,0 (179/179)	1	100,0 (180/180)	1	100,0 (105/105)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	B	100,0 (180/180)	2	100,0 (179/179)	2	100,0 (98/98)	
	C	100,0 (180/180)	3	100,0 (180/180)	3	100,0 (105/105)	
					4	100,0 (96/96)	
					5	100,0 (102/102)	
					6	100,0 (33/33)	

* *Il y a un jour 6 parce que les séries non valides des jours 1 à 5 ont été répétées.*

* *IC à 95 % = intervalle de confiance binomial exact à 95 %.*

Sensibilité analytique – étalon de Santé Canada – souche 1

La limite de détection (LDD) du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a été évaluée à l'aide de l'étalon de référence de Santé Canada pour le virus du Nil occidental[11] (Maladies infectieuses, Société canadienne du sang, 1800 Alta Vista, Ottawa, Ontario, K1G 4J5). Les panels ont été préparés par dilution de l'étalon dans un plasma humain normal et négatif au virus. Chaque dilution a été testée à l'aide de trois lots différents du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Un total de 30 réplicats par lot de trousse ont été testés pour un total de 90 réplicats par concentration. À l'aide des données combinées provenant de tous les réplicats testés, la LDD a été établie selon le taux de positivité avec les limites de fiabilité inférieures à 95 % (unilatérale) ainsi que calculée par l'analyse PROBIT pour évaluer la limite de détection de 95 % et les intervalles de confiance bilatéraux de 95 % du panel (Tableau 2). La LDD de 95 % estimée à l'aide de l'étalon de Santé Canada – souche 1 était de 40,3 copies/ml.

Tableau 2
Résumé de sensibilité analytique selon l'étalon de virus du Nil occidental de Santé Canada

Valeur nominale (copies/ml)	Nombre d'échantillons réactifs	Nombre de tests individuels	% de réactifs	Limite de fiabilité inférieure à 95 % (unilatérale)
0	0	89*	0	S.O.
5	10	90	11,1	6,2 %
10	43	90	47,8	38,7 %
20	70	90	77,8	69,4 %
25	74	90	82,2	74,3 %
30	76	90	84,4	76,8 %
35	85	90	94,4	88,7 %
50	89	90	98,9	94,8 %
Analyse PROBIT	Taux de détection (%)	Concentration (copies/ml)	Limite inférieure de confiance à 95 % (copies/ml)	Limite supérieure de confiance à 95 % (copies/ml)
	95	40,3	35,1	47,8

*Un réplicat était non valide.

Sensibilité analytique – étalon secondaire de VNO de Roche – souche 1

La limite de détection (LDD) du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a été évaluée à l'aide de l'étalon secondaire de Roche (stock de virus du Nil occidental Zeptometrix, NY 2001-6263, lot n° 302142, étalonné selon l'étalon de référence de virus du Nil occidental de Santé Canada). Les panels ont été préparés par dilution de l'étalon dans un plasma humain normal et négatif au virus. Chaque dilution a été testée à l'aide de trois lots différents du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Un total de 64 réplicats par lot de trousse ont été testés pour un total de 192 réplicats par concentration. À l'aide des données combinées provenant de tous les réplicats testés, la LDD a été établie selon le taux de positivité avec les limites de fiabilité inférieures à 95 % (unilatérale) ainsi que calculée par l'analyse PROBIT pour évaluer la limite de détection de 95 % et les intervalles de confiance bilatéraux de 95 % du panel (Tableau 3). La LDD de 95 % estimée à l'aide de l'étalon de Roche – souche 1 était de 36,9 copies/ml.

Tableau 3
Résumé de sensibilité analytique selon l'étalon secondaire de VNO de Roche

Valeur nominale (copies/ml)	Nombre d'échantillons réactifs	Nombre de tests individuels	% de réactifs	Limite de fiabilité inférieure à 95 % (unilatérale)
0	0	192	0	S.O.
5	68	192	35,4	29,7 %
10	110	191*	57,6	51,4 %
20	153	192	79,7	74,3 %
25	173	192	90,1	85,8 %
30	182	192	94,8	91,3 %
35	183	192	95,3	92,0 %
50	187	192	97,4	94,6 %
Analyse PROBIT	Taux de détection (%)	Concentration (copies/ml)	Limite inférieure de confiance à 95 % (copies/ml)	Limite supérieure de confiance à 95 % (copies/ml)
	95	36,9	32,7	42,6

*Un réplicat était non valide.

Sensibilité analytique – panel de virus du Nil occidental de CBER et de la FDA – souche 1

La limite de détection (LDD) du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a été évaluée à l'aide du panel de virus du Nil occidental de CBER et de la FDA. Le panel est composé de 14 membres dérivés d'un isolat de souche 1 du virus du Nil occidental humain (Hu2002) et d'un isolat de souche 1 du virus du Nil occidental de flamant (NY99) (fabriqué pour CBER par BBI Diagnostics, 375 West Street, West Bridgewater, MA, 02379). Chaque membre du panel a été testé en double à l'aide de trois lots différents du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen (Tableau 4).

Tableau 4
Résumé de sensibilité analytique selon le panel de virus du Nil occidental de CBER et de la FDA

ID du membre	Isolat de souche 1	Valeur nominale (copies/ml)	% de réactifs
CBER/FDA – 03	Hu2002	0	0 % (0/6)
CBER/FDA – 05	NY99	0	0 % (0/6)
CBER/FDA – 09	Hu2002	5	50 % (3/6)
CBER/FDA – 10	NY99	5	83 % (5/6)
CBER/FDA – 12	Hu2002	10	50 % (3/6)
CBER/FDA – 02	NY99	10	33 % (2/6)
CBER/FDA – 04	Hu2002	50	100 % (6/6)
CBER/FDA – 13	NY99	50	100 % (6/6)
CBER/FDA – 07	Hu2002	100	100 % (6/6)
CBER/FDA – 01	NY99	100	100 % (5/5)*
CBER/FDA – 14	Hu2002	500	100 % (6/6)
CBER/FDA – 11	NY99	500	100 % (6/6)
CBER/FDA – 08	Hu2002	1000	100 % (6/6)
CBER/FDA – 06	NY99	1000	100 % (6/6)

*Un réplicat était non valide.

Sensibilité analytique – panel de qualification QWN701 d'ARN du virus du Nil occidental – souche 2

La limite de détection (LDD) du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® a été évaluée à l'aide du panel de qualification QWN701 d'ARN du virus du Nil occidental (stock de virus du Nil occidental, souche 2[12,13], Ouganda – BBI Diagnostics, 375 West Street, West Bridgewater, MA, 02379). Le stock de virus a été étalonné par le fournisseur à l'aide d'un test de RT PCR basé sur le TaqMan®[14]. Les panels ont été préparés par dilution des étalons dans un plasma humain normal et négatif au virus. Chaque dilution a été testée à l'aide de trois lots différents du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Un total de 30 réplicats par lot de trousse ont été testés pour un total de 90 réplicats par concentration. À l'aide des données combinées provenant de tous les réplicats testés, la LDD a été établie selon le taux de positivité avec les limites de fiabilité inférieures à 95 % (unilatérale) ainsi que calculée par l'analyse PROBIT pour évaluer la limite de détection de 95 % et les intervalles de confiance bilatéraux de 95 % du panel (Tableau 5). La LDD de 95 % estimée à l'aide du panel de qualification QWN701 d'ARN du virus du Nil occidental – souche 2 était de 3,8 copies/ml.

Tableau 5
Résumé de sensibilité analytique selon le panel de qualification QWN701 de l'ARN du virus du Nil occidental – souche 2

Valeur nominale (copies/ml)	**Nombre d'échantillons réactifs**	**Nombre de tests individuels**	**% de réactifs**	**Limite de fiabilité inférieure à 95 % (unilatérale)**
0,00	0	90	0	S.O.
0,25	22	90	24	17,2 %
0,50	29	90	32	24,1 %
1,00	48	90	53	44,1 %
1,50	68	90	76	67,0 %
3,00	85	90	94	88,7 %
5,00	90	90	100	96,7 %
Analyse PROBIT	Taux de détection (%)	Concentration (copies/ml)	Limite inférieure de confiance à 95 % (copies/ml)	Limite supérieure de confiance à 95 % (copies/ml)
	95	3,8	2,3	11,1

Spécificité analytique – réactions croisées potentielles et interférence de micro-organismes

La spécificité analytique du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a été évaluée par le test d'un panel de 52 micro-organismes, dont 47 isolats viraux, 4 souches bactériennes et 1 isolat de levure (Tableau 6). Les micro-organismes ont été ajoutés au plasma humain normal et négatif au virus, puis testés avec et sans le virus du Nil occidental ajouté à une concentration de 3x la limite de détection du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. À l'exception des 4 isolats de la famille de virus de l'encéphalite japonaise (encéphalite japonaise, encéphalite Murray Valley, encéphalite de Saint-Louis et virus Kunjin), le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a donné des résultats non réactifs pour tous les échantillons de micro-organismes sans virus du Nil occidental ajouté et des résultats réactifs pour tous les échantillons de micro-organismes avec le virus du Nil occidental ajouté. Les 4 isolats de la famille de virus de l'encéphalite japonaise ont été réactifs dans les 8 réplicats du test. Ces résultats étaient prévus puisque ces virus possèdent une séquence de nucléotides homologue à celle du virus du Nil occidental ainsi qu'aux amorces et aux sondes du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

Tableau 6
Microorganismes testés

Adénovirus, type 2	Virus de l'hépatite C, génotype 6	HIV-1, sous-type A
Adénovirus, type 3	Cellules MJ (G11) produisant le HTLV-I	HIV-1, sous-type B
Adénovirus, type 7	Cellules C5/MJ produisant le HTLV-I	HIV-1, sous-type C
Candida albicans	Cellules MoT produisant le HTLV-II	HIV-1, sous-type D
Cytomégalovirus Davis	Chaîne delta H6H11 pleine longueur du HTLV-II	HIV-1, sous-type E
Cytomégalovirus Towne	Herpès simplex, type I, F	HIV-1, sous-type F
Virus Epstein-Barr avec cellules RAJI	Herpès simplex, type I, HF	HIV-1, sous-type G
Virus Epstein-Barr avec cellules P3	Herpès simplex, type I, MacIntyre	HIV-1, sous-type H
Virus de l'hépatite A (PA 21)	Herpès simplex, type II, G	HIV-2
Virus de l'hépatite B, génotype A	Herpès simplex, type II, MS	*Pneumocystis carinii* D&D
Virus de l'hépatite B, génotype B	Virus du papillome humain, type 11	*Propionibacterium acnes*
Virus de l'hépatite C, génotype 1a	Virus du papillome humain, type 18	*Staphylococcus aureus*
Virus de l'hépatite C, génotype 1b	Virus du papillome humain, type 6B	*Staphylococcus epidermidis*
Virus de l'hépatite C, génotype 2a	Virus de l'influenza, type A (A/New Jersey/8/76)	Virus de l'encéphalite japonaise
Virus de l'hépatite C, génotype 2b	Virus de l'influenza, type B (B/Hong Kong/5/72)	Virus de l'encéphalite Murray Valley
Virus de l'hépatite C, génotype 3	Virus varicelle-zona Ellen	Virus de l'encéphalite de Saint-Louis
Virus de l'hépatite C, génotype 4	Virus varicelle-zona Oka	Virus Kunjin
Virus de l'hépatite C, génotype 5		

Spécificité analytique – autres problèmes de santé

Des échantillons de plasma provenant de 10 à 20 patients de chacune des catégories de maladie suivantes (infection au cytomégalovirus, infection par le virus de l'hépatite A, infection par le virus de l'hépatite B, infection par le virus de l'hépatite C, virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1), infection par le virus Epstein-Barr) ont été testés avec ou sans l'ajout du VNO à une concentration de 3x la limite de détection du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a produit des résultats non réactifs sur tous les échantillons de problèmes de santé sans l'ajout du VNO, et des résultats réactifs sur tous les échantillons avec ajout du VNO. Ces problèmes de santé n'ont pas nui à la sensibilité ou à la spécificité du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

Substances potentiellement interférentes

Substances endogènes interférentes

Des échantillons de plasma, dont les niveaux de triglycérides (jusqu'à 2487 mg/dl), d'hémoglobine (jusqu'à 516 mg/dl), de bilirubine (jusqu'à 23,5 mg/dl) ou d'albumine (jusqu'à 6900 mg/dl) étaient anormalement élevés, ont été testés avec ou sans l'ajout du virus du Nil occidental à une concentration de 3x la limite de détection du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Ces substances endogènes n'ont pas nui à la sensibilité ni à la spécificité du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

Des échantillons de plasma de patients présentant une maladie ou une condition auto-immune établie (anticorps antinucléaire positif, facteur rhumatoïde positif et lupus érythémateux disséminé) ont été testés avec ou sans l'ajout du virus du Nil occidental à une concentration de 3x la limite de détection du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Ces substances endogènes n'ont pas nui à la sensibilité ni à la spécificité du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

Des échantillons de plasma auxquels des globules rouges ont été ajoutés à une concentration anormalement élevée (jusqu'à 10 % vol/vol) ont été testés avec et sans l'ajout du virus du Nil occidental à une concentration de 3x la limite de détection du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Le plasma auquel 10 % (vol/vol) de globules rouges ont été ajoutés a nui à la sensibilité et à la spécificité du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

Substances exogènes interférentes

Des échantillons de plasma contenant une concentration anormalement élevée d'acétaminophène (1324 µmol/L), d'acide acétylsalicylique (3,62 µmol/L), d'atorvastatine (600 Éq/L), de fluoxétine (11,2 µmol/L), de loratadine (0,78 µmol/L), de nadolol (3,88 µmol/L), de naproxène (2170 µmol/L), de paroxétine (3,04 µmol/L), de sertraline (1,96 µmol/L), d'acide ascorbique (284 µmol/L), d'ibuprofène (2425 µmol/L) ou de phényléphrine HCl (327,5 µmol/L) ont été testés avec ou sans le virus du Nil occidental ajouté à une concentration de 3x la limite de détection du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Ces substances exogènes n'ont pas nui à la sensibilité ni à la spécificité du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

ÉCHANTILLONS DE CADAVRES

Reproductibilité

Vingt échantillons de plasma EDTA de donneurs vivants et 20 échantillons de plasma EDTA de cadavres ont été dopés avec la cible virale du VNO au moyen de l'étalon secondaire de VNO de Roche à une concentration finale de 3 fois la LDD, conformément au niveau d'hémolyse de chaque échantillon. Les échantillons de cadavres étaient dilués manuellement dans un rapport de 1:5 avec le diluant d'échantillons de cadavres **cobas**® TaqScreen et testés en suivant la procédure de test des échantillons de cadavres. Chacun des 20 échantillons de cadavres et de donneurs vivants ont été testés en simple par 2 opérateurs au moyen de trois lots de trousse du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Chaque opérateur était apparié à un système **cobas s** 201 afin de créer deux paires opérateur-appareil.

Toutes les données de reproductibilité valides ont été analysées en comparant les taux de réactivité pour le VNO des échantillons de cadavres et de donneurs vivants dopés entre trois lots de trousse (tableau 7) et deux paires opérateur-appareil (tableau 8). Les résultats ont été évalués au moyen du test exact de Fisher unilatéral afin de déterminer si les différences dans les taux de réactivité pour les échantillons de cadavres et de donneurs vivants étaient significatives.

Tableau 7
Résumé de reproductibilité des échantillons de cadavres et de donneurs vivants – Résultats par lot de trousse

Cible virale	Type de donneur	Lot n° 1	Lot n° 2	Lot n° 3	Valeur p Échantillons de donneurs vivants *vs* Échantillons de cadavres
VNO	Cadavres	40 / 40 (100 %)	39 / 39* (100 %)	40 / 40 (100 %)	1,0
	Donneurs	39 / 39* (100 %)	39 / 39* (100 %)	40 / 40 (100 %)	
Valeur p unilatérale Échantillons de donneurs vivants *vs* de cadavres par lot de réactif		1,0	1,0	1,0	

* Un réplicat était non valide

Remarque : Les valeurs p pour le test exact de Fisher supérieures à 0,05 ne sont pas statistiquement significatives.

Tableau 8
Résumé de reproductibilité des échantillons de cadavres et de donneurs vivants – Résultats par paire opérateur-appareil

Cible virale	Type de donneur	Opérateur-Appareil n° 1	Opérateur-Appareil n° 2	Valeur p Échantillons de donneurs vivants *vs* Échantillons de cadavres
VNO	Cadavres	60 / 60 (100 %)	59 / 59* (100 %)	1,0
	Donneurs	59 / 59* (100 %)	59 / 59* (100 %)	
Valeur p unilatérale Échantillons de donneurs vivants *vs* de cadavres par paire opérateur-appareil		1,0	1,0	

* Un réplicat était non valide

Remarque : Les valeurs p pour le test exact de Fisher supérieures à 0,05 ne sont pas statistiquement significatives.

Spécificité

Soixante-dix échantillons individuels de plasma EDTA de donneurs vivants et soixante-et-onze échantillons individuels de plasma EDTA de cadavres négatifs pour l'ARN du VNO ont été répartis en trois groupes, et chaque groupe a été testé avec un de trois lots de trousse de test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Les échantillons de plasma EDTA de cadavres ont été répartis en trois groupes de 25, 21 et 25 échantillons et manuellement dilués dans un rapport de 1:5 avec du diluant d'échantillons de cadavres **cobas**® TaqScreen puis testés conformément à la procédure de test des échantillons de cadavres. Les échantillons de plasma EDTA de donneurs vivants ont été répartis en trois groupes de 25, 20 et 25 échantillons et manuellement dilués dans un rapport de 1:6 avec un pool de plasma EDTA négatif pour l'ARN du VNO avant le test afin de simuler la procédure de six tests recommandée pour le test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

Pour les échantillons de cadavres, soixante-neuf résultats valides ont été obtenus avec trois lots de trousse. Les soixante-neuf résultats étaient non-réactifs pour l'ARN du VNO, soit une spécificité de 100 %. Pour les échantillons de donneurs vivants, soixante-dix résultats valides ont été obtenus avec les trois mêmes lots de trousse. Un échantillon était initialement réactif lors du test, mais à la reprise du test en double, il était non-réactif pour l'ARN du VNO. Le résumé des résultats du test de spécificité est présenté au tableau 9.

Tableau 9
Résumé des tests de spécificité des échantillons de cadavres et de donneurs vivants avec le test de dépistage du VNO cobas® TaqScreen

Lot de réactif	Échantillons de cadavres			Échantillons de donneurs vivants (dilués dans un rapport de 1:6)		
	Nombre de résultats valides	Nombre de résultats non-réactifs	Nombre de résultats réactifs	Nombre de résultats valides	Nombre de résultats non-réactifs	Nombre de résultats réactifs
Lot n° 1	23	23	0	25	25	0
Lot n° 2	21	21	0	20	20	0
Lot n° 3	25	25	0	25	24	1**
Total	69*	69	0	70	69	1
Spécificité	100 %			98,6 %		

*Exclut les résultats invalides initiaux
**Résultats non-réactifs lors de la reprise des tests en double

Sensibilité analytique dans les échantillons de cadavres avec l'étalon secondaire de VNO de Roche

La limite de détection (LDD) du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a été évaluée sur des échantillons de plasma EDTA de cadavres à l'aide de l'étalon secondaire de VNO de Roche (stock de virus du Nil occidental Zeptometrix, NY 2001-6263, lot n° 302142, étalonné selon l'étalon de référence de virus du Nil occidental de Santé Canada). Des panels modérément hémolysés ont été préparés par dilution de l'étalon dans un pool de plasma EDTA de cadavre négatif au virus comprenant des échantillons de cadavres individuels dont il avait été déterminé qu'ils appartenaient à la catégorie des échantillons modérément hémolysés (de couleur paille à rose). La matrice d'échantillons hautement hémolysés était une matrice artificielle comprenant du sang total conservé lysé mélangé à du plasma EDTA afin de représenter un échantillon clinique hautement hémolysé (de couleur rouge foncé ou brun). Il a été vérifié que la matrice d'échantillons hautement hémolysés était négative pour l'ARN du VNO avant la préparation des panels de dilution. On a utilisé deux lots de trousse de test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen pour tester les panels modérément hémolysés et un lot de trousse de test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen pour tester les panels hautement hémolysés. Pour chaque matrice, à l'aide des données combinées tirées de tous les réplicats testés, la LDD a été établie selon le taux de positivité avec les limites inférieures des intervalles de confiance à 95 % (unilatéraux) et calculée par analyse PROBIT pour évaluer la limite de détection de 95 % et les intervalles de confiance bilatéraux à 95 % du panel (tableaux 10 et 11). La LDD à 95 % estimée par analyse PROBIT au moyen de l'étalon secondaire de VNO de Roche pour les échantillons de cadavres modérément hémolysés était de 117,4 copies/ml et de 365,1 copies/ml pour la matrice d'échantillons hautement hémolysés.

Tableau 10
Résumé de sensibilité analytique selon l'étalon secondaire de VNO de Roche avec les échantillons de cadavres modérément hémolysés

Valeur nominale (copies/ml)	**Nombre d'échantillons réactifs**	**Nombre de tests individuels**	**% Réactifs**	**Limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % (unilatéral)**
40	28	43	65,1	51,5 %
90	38	44	86,4	74,9 %
120	64	66	97,0	90,8 %
140	64	66	97,0	90,8 %
160	65	66	98,5	93,0 %
200	65	66	98,5	93,0 %
Analyse PROBIT	Taux de détection (%)	Concentration (copies/ml)	Limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % (copies/ml)	Limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % (copies/ml)
	95	117,4	97,8	150,7

Tableau 11
Résumé de sensibilité analytique selon l'étalon secondaire de VNO de Roche avec une matrice d'échantillons hautement hémolysés

Valeur nominale (copies/ml)	**Nombre d'échantillons réactifs**	**Nombre de tests individuels**	**% Réactifs**	**Limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % (unilatéral)**
200	39	44	88,6	77,6 %
330	43	44	97,7	89,7 %
400	43	44	97,7	89,7 %
425	43	43*	100,0	93,3 %
450	43	44	97,7	89,7 %
525	43	44	97,7	89,7 %
Analyse PROBIT	Taux de détection (%)	Concentration (copies/ml)	Limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % (copies/ml)	Limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % (copies/ml)
	95	365,1	285,6	873,0

*Un réplicat était non valide.

Sensibilité

Soixante échantillons de plasma EDTA de cadavres choisis aléatoirement non réactifs pour l'ARN du VNO et classés par niveau d'hémolyse [échantillon modérément hémolysé (de couleur paille à rose) ou échantillon hautement hémolysé (de couleur rouge à rouge foncé ou brun)] ont été répartis en 5 groupes de 12 échantillons par groupe. Les échantillons de chaque groupe ont été dopés avec la cible virale de VNO en utilisant un isolat clinique différent pour chaque groupe à une concentration finale d'environ 570 copies/ml (3 x 190 copies/ml) pour les échantillons de cadavres modérément hémolysés et environ 990 copies/ml (3 x 330 copies/ml) pour les échantillons de cadavres hautement hémolysés. Ces échantillons dopés avec de l'ARN de VNO ont été testés soit immédiatement après le dopage ou dans le mois ayant suivi le dopage, période au cours de laquelle les échantillons étaient conservés à une température de ≤-80 °C. Dans tous les cas, chaque échantillon a été manuellement dilué dans un rapport de 1:5 avec le diluant d'échantillons de cadavres **cobas**® TaqScreen avant le test. Quatre des douze échantillons dans chaque groupe ont été testés avec un lot de trousse de réactif, et trois lots de trousse de réactif ont été utilisés dans cette étude, pour un total de 20 échantillons testés par lot de trousse de réactif. Le taux de réactivité du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen était de 100 % [IC à 95 % : 94 - 100 %] pour tous les échantillons de cadavres testés dans cette étude. Le résumé des résultats du test de spécificité est présenté au tableau 12.

Tableau 12
Résumé de sensibilité au VNO avec des échantillons de cadavre modérément hémolysés (MH) et hautement hémolysés (HH)

Lot de trousse	Type d'échantillon de cadavre	VNO
Lot n° 1	MH	14/14
	HH	6/6
Lot n° 2	MH	13/13
	HH	7/7
Lot n° 3	MH	16/16
	HH	4/4
Total	MH + HH	60/60
Sensibilité	100 % [IC à 95 % : 94,0 - 100 %]	

PERFORMANCE CLINIQUE – ÉCHANTILLONS DE DONNEURS VIVANTS

Sensibilité clinique – Test d'échantillons positifs connus du virus du Nil occidental

La sensibilité clinique du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a été évaluée à l'aide d'un test sur 315 échantillons cliniques positifs au virus du Nil occidental. Les échantillons ont été établis positifs à l'ARN du virus du Nil occidental par une de trois méthodes de test d'acides nucléiques. L'étude a été menée dans 3 laboratoires d'essai, qui ont chacun testé environ 100 échantillons, autant purs que dilués à 1:6, à l'aide de trois lots différents du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen.

Dans le cadre de cette étude, la sensibilité du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a été de 100 % (IC à 95 % 98,8-100,0) avec les échantillons purs et de 97,5 % (IC à 95 % 95,1-98,9) avec les échantillons dilués à 1:6 (tableau 13). Les huit (8) échantillons dilués à 1:6 et non réactifs provenaient d'échantillons purs dont la charge virale établie était de moins de 100 copies/ml selon l'essai de PCR quantitatif du VNO du National Genetics Institute.

Tableau 13
Sensibilité clinique d'échantillons positifs connus du virus du Nil occidental

	Nombre d'échantillons testés	Nombre d'échantillons réactifs	Nombre d'échantillons non réactifs	Sensibilité (%)	Sensibilité (IC à 95 %)	
					Limite inférieure	Limite supérieure
Pur	314*	314	0	100	98,8	100.0
Dilué 1:6	315	307	8	97,5	95,1	98,9

*Un échantillon pur était non valide.

Spécificité clinique

La spécificité clinique du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a été évaluée par un test sur des dons de sang total sélectionnés au hasard dans six laboratoires externes. Les échantillons individuels et les échantillons en pools de six ont été testés. Trois lots différents du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen ont été utilisés au cours de l'étude. La spécificité clinique du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen a été calculée comme le pourcentage (intervalle de confiance [IC] binomial bilatéral exact à 95 %) des donneurs négatifs au VNO qui ont obtenu des résultats non réactifs au test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen. Il y avait 86 935 donneurs mesurables provenant des tests de pools et 10 375 donneurs mesurables provenant des tests individuels.

Résultats des tests de pools

Le tableau 14 illustre le calcul de la spécificité clinique du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen pour les 86 935 donneurs mesurables des tests de pools. La spécificité clinique du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen des tests de pools était de 100 % (86 935/86 935; IC à 95 % = 99,996 % à 100,000 %) dans le cadre de cette étude.

Tableau 14
Spécificité clinique du test de dépistage du virus du Nil occidental cobas® TaqScreen – tests de pools

Critère d'évaluation du VNO*	État du donneur au VNO**				Total
	Positifs	Présumé positif***	Négatifs	Inconnu****	
Réactif au VNO	0 (s.o.)	0 (s.o.)	0 (0,000 %)	0 (s.o.)	0
Non réactif au VNO	0 (s.o.)	0 (s.o.)	86 935 (100,000 %)	0 (s.o.)	86 935
Total	0	0	86 935	0	86 935
Spécificité clinique (IC à 95 %)			100,000 % (99,996 %, 100,000 %)		

* Le critère d'évaluation du VNO a été dérivé du résultat valide du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen de l'essai sur l'index de don, à l'aide de l'algorithme de test en pools.

** L'état du donneur au VNO a été attribué par programme selon les profils de réactivité du test sur l'index de don et, le cas échéant, les dons de suivi.

*** Un état du donneur au VNO « Présumé positif » a été attribué par programme aux donneurs sans don d'étude de suivi mais qui ont obtenu un résultat réactif au test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen et au moins 1 résultat réactif ou positif sur la source de plasma secondaire, le TAN secondaire ou l'IgM pour l'index de don.

**** Les donneurs avec un état au VNO inconnu sont des donneurs dont les résultats du test étaient insuffisants pour leur attribuer un état au VNO.

La spécificité du pool du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen de l'index de don était de 99,986 % (14 387/14 389; IC à 95 % = 99,950 % à 99,998 %). Deux pools de 6 étaient réactifs au test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen, mais les deux contenaient des échantillons non réactifs au test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen au niveau de l'échantillon individuel. Les résultats d'échantillons en pools ont affiché un taux non valide de 2,3 % en raison d'une défaillance du témoin interne ou de l'appareil.

Résultats des tests individuels

Le tableau 15 illustre le calcul de la spécificité clinique du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen pour les 10 375 donneurs mesurables des tests individuels. La spécificité clinique du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen des tests individuels était de 100 % (10 375/10 375; IC à 95 % = 99,964 % à 100,000 %) dans le cadre de cette étude. Les résultats d'échantillons individuels ont affiché un taux non valide de 1,1 % en raison d'une défaillance du témoin interne ou de l'appareil.

Tableau 15
Spécificité clinique du test de dépistage du virus du Nil occidental cobas® TaqScreen – tests individuels

Critère d'évaluation du VNO*	État du donneur au VNO**				Total
	Positifs	Présumé positif***	Négatifs	Inconnu****	
Réactif au VNO	0 (s.o.)	0 (s.o.)	0 (0,000 %)	0 (s.o.)	0
Non réactif au VNO	0 (s.o.)	0 (s.o.)	10 375 (100,000 %)	0 (s.o.)	10 375
Total	0	0	10 375	0	10 375
Spécificité clinique (IC à 95 %)			100,000 % (99,964 %, 100,000 %)		

* Le critère d'évaluation du VNO a été dérivé du résultat valide du test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen de l'essai sur l'index de don, à l'aide de l'algorithme de test en pools.

** L'état du donneur au VNO a été attribué par programme selon les profils de réactivité du test sur l'index de don et, le cas échéant, les dons de suivi.

*** Un état du donneur au VNO « Présumé positif » a été attribué par programme aux donneurs sans don d'étude de suivi mais qui ont obtenu un résultat réactif au test de dépistage du virus du Nil occidental **cobas**® TaqScreen et au moins 1 résultat réactif ou positif sur la source de plasma secondaire, le TAN secondaire ou l'IgM pour l'index de don.

**** Les donneurs avec un état au VNO inconnu sont des donneurs dont les résultats du test étaient insuffisants pour leur attribuer un état au VNO.

BIBLIOGRAPHIE

1. Petersen L.R., Marfin, A.A. A primer for the clinician, Ann Intern Med 2002; **137**:173-179.

2. Kramer, L.D., Bernard, K.A. West Nile Virus in the western hemisphere, Curr Opin Infect Dis 2001; **14(5)**:519-525.

3. Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene **93**:125-128.

4. Savva, R., McAuley-Hecht, K., Brown, T., Pearl, L. 1995. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. Nature **373**:487-493.

5. Mol, C. D., Arvai, A. S., Slupphaug, G., Kavli, B., Alseth, I., Krokan, H. E., Tainer, J. A. 1995. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. Cell **80**:869-878

6. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y). **10**:413-417.

7. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research **6**:986-994.

8. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. (eds.). 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories HHS Publication Number (CDC) 93-8395.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA:CLSI, 2005.

10. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.

11. Saldanha, J., Shead, S., Heath, A., Drebot, M., and the West Nile Virus Collaborative Group. 2005. Collaborative study to evaluate a working reagent for West Nile virus RNA detection by nucleic acid testing. Transfusion **45**:97-102.

12. Briese, T., Rambaut, A., Pathmajeyan, M., Bishara, J., Weinberger, M., Pitlik, S., Lipkin, W.I. 2002. Phylogenetic analysis of human isolate from the 2000 Israel West Nile virus epidemic. Emererging Infectious Diseases **8(5)**:528-531.

13. Hayes, C.G., West Nile Virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. Annals of the New York Academy of Sciences, **951**:25-37.

14. Ji, J., Chen, X., Manak, M., 2001. TaqMan® Probe Assay for the Detection of West Nile Virus, 16th Annual San Diego Conference New Technologies for Molecular Diagnostics. Clinical Chem. 2001; **47**:2078-2085. (Poster 11).

Information sur les révisions apportées au document	
Doc Rev. 4.0 05/2014	Suppression du symbole « Dangereux pour l'environnement ». Retrait de la phrase « Tous droits réservés » du copyright. Mise à jour des descriptions de la page des symboles harmonisés à la fin de la notice. Retrait du nom « ROCHE » de l'énoncé relatif à la marque. Veuillez communiquer avec le représentant de Roche de votre région si vous avez d'autres questions.

Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA
N° de licence aux É.-U. : 1636

D

Distributed by Roche Diagnostics
201, boulevard Armand-Frappier
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877 273 3433)

COBAS, COBAS S, TAQMAN, TAQSCREEN, AMPLILINK, AMPERASE et AMPLIPREP sont des marques de commerce de Roche.

MICROLAB est une marque de commerce de Hamilton Company.

ARMORED RNA est une technologie brevetée mise au point par Ambion, Inc. et Cenetron Diagnostics LLC. Brevets américains n° 5,677,124, n° 5,919,625 et n° 5,939,262 et brevets en instance.

ARMORED RNA est une marque de commerce d'Ambion and Cenetron.

PROCLIN est une marque de commerce de Rohm and Haas Company.

MICROCIDE SQ est une marque de commerce de Global Biotechnologies, Inc.

Les colorants de cyanine contenus dans ce produit sont soumis aux droits de brevets de GE Healthcare Bio-Sciences Corp. et de l'Université Carnegie Mellon et sont concédés sous licence à Roche uniquement dans le but d'être incorporés à des composants de trousses de recherche et de diagnostic *in vitro*. Toute utilisation de ces trousses dans un but autre que la recherche ou le diagnostic *in vitro* requiert la concession de sous-licences par GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey, É.-U. et par l'Université Carnegie Mellon, Pittsburgh, Pennsylvanie, É.-U.

©2014 Roche Molecular Systems, Inc.

05/2014 05618169001-04

Doc Rev. 4.0

EC REP

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany

CE

Les symboles suivants sont désormais en usage pour l'étiquetage des produits diagnostiques par PCR de Roche.

Logiciel auxiliaire

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

Mandataire dans la Communauté européenne

Limite inférieure de la plage assignée

Fiche technique à codes-barres

Fabricant

Code du lot

Conserver dans un endroit sombre

Risques biologiques

Suffisant pour <n> tests

Référence du catalogue

Limites de température

Consulter les instructions d'utilisation

Fichier de définition de tests

Contenu de la trousse

Limite supérieure de la plage assignée

Distributeur

Utiliser jusque

Pour évaluation de performance IVD uniquement

Ce produit répond aux exigences de la Directive Européenne 98/79 CE concernant les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.